

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ МЕТИЛОБОГАЩЕННОЙ ДИЕТЫ МАТЕРИ НА ЧИСЛО  
ДОФАМИНОВЫХ НЕЙРОНОВ В ВЕНТРАЛЬНОЙ ТЕГМЕНТАЛЬНОЙ  
ОБЛАСТИ МОЗГА У ВЗРОСЛОГО ПОТОМСТВА КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij**

© 2023 г. Е. А. Федосова<sup>1</sup>, \*, Н. А. Логинова<sup>1</sup>, К. Ю. Саркисова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

*\*E-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

Поступила в редакцию 14.04.2023 г.

После доработки 25.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Крысы линии WAG/Rij являются генетической моделью абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией. Показано, что патологический фенотип у крыс линии WAG/Rij связан с пониженным дофаминовым (ДА) тономом в мезолимбической системе мозга. Ранее было обнаружено, что материнская метилобогатая диета (МОД) в перинатальном периоде повышает содержание ДА в мезолимбической ДА-ергической системе мозга и уменьшает проявление абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Вентральная тегментальная область (ventral tegmental area, VTA), содержащая тела ДА-ергических клеток, является главным источником синтеза мезолимбического ДА. Цель настоящей работы – проверить гипотезу о том, что повышение ДА-ергического тонуса мезолимбической системы мозга, вызываемое материнской МОД у потомства, может быть обусловлено увеличением числа ДА-ергических нейронов, активно синтезирующих тирозингидроксилазу (ТН) в VTA, которая является началом мезокортикального и мезолимбического ДА-ергических путей. Использовали метод иммуногистохимического окрашивания на ТН для оценки числа ТН-иммунопозитивных клеток у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими контрольную диету или МОД, и подвергнутых и не подвергнутых поведенческому тестированию в течение 2 дней подряд в тестах свето-темнового выбора, открытого поля, приподнятого крестообразного лабиринта и вынужденного плавания. Через 1 ч после теста вынужденного плавания была проведена транскардиальная перфузия с целью фиксации головного мозга. Число ДА-ергических нейронов определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток на срезах мозга на уровне VTA. Число ТН-иммунопозитивных клеток подсчитывали в левом и правом полушариях мозга в отдельности. Установлен значимый эффект МОД матери на число клеток в VTA, экспрессирующих ТН. У взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, число ТН-иммунопозитивных клеток было больше по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими контрольную диету. Кроме того, у потомства крыс, рожденного матерями, потреблявшими МОД, число ТН-иммунопозитивных клеток было больше у животных, подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению с животными, которых не подвергали поведенческому тестированию. Эффект материнской диеты и поведенческого тестирования на число ТН-иммунопозитивных клеток в VTA был выражен одинаково в правом и левом полушариях мозга. Результаты свидетельствуют о том, что материнская диета в перинатальном периоде может влиять на развитие мезолимбической ДА-ергической системы мозга, способствуя образованию и/или сохранности ДА-ергических

нейронов в VTA, и тем самым предотвращать возникновение генетической абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij.

*Ключевые слова:* абсанс-эпилепсия, коморбидная депрессия, DA-нейроны, VTA, материнская метилобогатая диета, мезолимбическая DA-ергическая система мозга, крысы линии WAG/Rij

**DOI:** 10.31857/S086981392307004X, **EDN:** XLJPDМ

## ВВЕДЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij – генетическая модель наследственной абсанс-эпилепсии с коморбидной депрессией [1–3]. Характерным признаком абсанс-эпилепсии является наличие спонтанных генерализованных пик-волновых разрядов на ЭЭГ, которые сопровождаются прекращением текущей деятельности и отсутствием реакции на внешние стимулы [3]. Ранее было показано, что крысы линии WAG/Rij по сравнению с крысами Wistar без судорожной патологии проявляют депрессивно-подобное поведение: пониженную исследовательскую активность в тесте открытого поля, повышенную иммобильность в тесте вынужденного плавания и пониженное потребление/предпочтение сахарозы в тесте потребления сахарозы [1–3]. К настоящему времени накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о дофамин (DA)-зависимом характере проявлений как абсанс-эпилепсии [3–5], так и коморбидной депрессии [6–8] у крыс линии WAG/Rij.

Несмотря на то, что патологический фенотип у крыс линии WAG/Rij генетически обусловлен, он может быть модифицирован, в том числе под влиянием ранних средовых факторов, таких как материнская забота [9, 10], обогащенная/обедненная среда [11] и диета матери во время перинатального периода [11–16]. Фенотип является результатом взаимодействия генотипа и среды. Факторы внешней среды могут индуцировать эпигенетические модификации, которые способны изменить экспрессию генов. Во многих случаях именно регуляция экспрессии гена служит решающим фактором для изменения фенотипа. Известно несколько механизмов регуляции генной экспрессии, наиболее изученным из которых является метилирование ДНК. Это стабильная, наследуемая и обратимая за счет процесса деметилирования химическая модификация молекулы ДНК. Метилируется преимущественно цитозин в составе так называемых “СрG-островков”, которые присутствуют в промоторных областях (промоторах) многих генов. Метилирование в промоторной зоне гена, как правило, приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена – негативная регуляция активности гена [17]. Метилирование ДНК также может повышать активность генов (позитивная регуляция) за счет связывания специальных m5CpG ДНК-связывающих белков с метилированными промоторами генов, что является необходимым условием для активации белков транскрипционного аппарата [18]. Метилирование ДНК особенно активно происходит в эмбриональный период и вскоре после рождения; определенный паттерн метилирования ДНК может сохраняться в течение всей жизни организма, а иногда и передаваться следующим поколениям [17].

С помощью изменения состава материнской диеты во время беременности удобно изучать влияние метилирования ДНК на экспрессию генов и проявление различных признаков у потомства животных-генетических моделей различных патологий [12–16]. В этих случаях транскрипция нуклеотидной последовательности гена может зависеть от количества метильных групп в определенном участке: если их много, транскрипция гена неактивна, но становится активной с их уменьшением (негативная регуляция экспрессии генов) [17, 19] или, наоборот, с увеличением (позитивная регуляция экспрессии генов) [18]. Для эпигенетической коррекции

различных патологий важно наличие в пищевом рационе матери незаменимой аминокислоты метионина (предшественника универсального донора метильной группы – S-аденозилметионина), а также компонентов цепи его метаболизма – холина, бетаина, фолиевой кислоты, витамина В<sub>12</sub> и цинка [11, 14, 16]. Материнская диета, обогащенная донорами метильных групп и кофакторами одноуглеродного цикла, способствовала подавлению генетически обусловленных аудиогенных припадков у крыс линии “0” и “4”, которые выведены на основе популяции гибридов крыс линии Крушинского–Молодкиной и крыс Wistar. Подавление аудиогенных припадков было выражено больше у крыс линии “0”, которые характеризуются низкой интенсивностью аудиогенных припадков. Коррекция эпилептического фенотипа при этом сопровождалась изменением метилирования и экспрессии некоторых генов: *Cpneb*, *Gtf2i*, *Scnr*, *ISfmbt* и *Phe2* [16].

В наших предыдущих работах [12, 13] было обнаружено, что метилобогатая диета (МОД) матери во время перинатального периода уменьшает проявление абсанс-эпилепсии (уменьшает число пик-волновых разрядов без изменения их длительности) и коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij. Коррекция патологического фенотипа у этих животных сопровождалась повышением экспрессии генов, в том числе гена тирозингидроксилазы (ТН) в прилежащем ядре [12, 13] – ключевой структуре мезолимбической ДА-ергической системы мозга, которая участвует в механизмах мотивации и подкрепления [7, 20]. ТН – это фермент, который лимитирует скорость биосинтеза ДА и норадреналина, превращая тирозин в диоксифенилаланин с использованием молекулярного кислорода и кофактора (тетрагидробиоптерина) [21]. Гипофункция мезолимбической ДА-ергической системы мозга является одним из ведущих механизмов патогенеза депрессивных расстройств у животных и человека [3], в том числе у крыс линии WAG/Rij [3, 7].

Результаты нашей предыдущей работы свидетельствуют о том, что коррекция патологического фенотипа у крыс линии WAG/Rij, вызываемая МОД матери [12, 13], сопровождается повышением ДА-ергического тонуса мезолимбической системы мозга [22]. Цель настоящей работы – проверить гипотезу о том, что повышение ДА-ергического тонуса в мезолимбической ДА-ергической системе мозга, вызываемое материнской МОД у потомства, может быть обусловлено увеличением числа ДА-ергических нейронов (активно синтезирующих ТН) в вентральной тегментальной области (ventral tegmental area, VTA), которая является началом мезокортикального и мезолимбического ДА-ергических путей [23]. Для достижения этой цели сопоставляли поведенческие показатели и число ДА-ергических нейронов в VTA у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД или контрольную диету (КД) во время перинатального периода.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Животные*

Работа выполнена на 20 6-месячных крысах-самцах линии WAG/Rij: 10 животных, рожденных матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа) и 10 животных, рожденных матерями, потреблявшими КД (контрольная группа). Для получения потомства самкам крыс линии WAG/Rij предоставляли КД или МОД в течение одной недели до беременности, во время спаривания и беременности, а также в течение одной недели после рождения детенышей. На 1 кг пищи использовали следующие метилсодержащие добавки: холин – 5 г; бетаин – 15 г; фолиевая кислота – 15 мг; витамин В<sub>12</sub> – 1.5 мг; L-метионин – 7.5 г; цинк – 150 мг [16]. Метилсодержащие добавки смешивали с 4-зерновой кашей, творогом и свежими яйцами. Во время спаривания самцы потребляли ту же диету, что и самки [12, 13, 22].

Всех животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде по 4–5 особей в клетке (70 × 40 × 40 см), в условиях естественного цикла день–ночь (день около 10 ч).

#### *Схема эксперимента*

Крысы экспериментальной и контрольной группы были разделены на 2 равные подгруппы, в каждой по 5 животных: одна из них подвергалась поведенческому тестированию, а другая – нет. Поведение оценивали в тестах открытого поля, светотемного выбора, приподнятого крестообразного лабиринта и принудительного плавания. Животных подгруппы, которая подвергалась поведенческому тестированию, анестезировали через 1 ч после теста принудительного плавания. Мозг фиксировали с помощью транскраниальной перфузии. Фиксированный мозг извлекали из черепной коробки и замораживали, после чего делали срезы мозга на уровне VTA. Таким образом, срезы были получены у 4 групп животных:

- 1) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, которые подвергались поведенческому тестированию;
- 2) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими МОД, которые не подвергались поведенческому тестированию;
- 3) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими КД, которые подвергались поведенческому тестированию;
- 4) 6-месячные крысы линии WAG/Rij, рожденные матерями, потреблявшими КД, которые не подвергались поведенческому тестированию.

Для идентификации DA-ергических нейронов в VTA использовали иммуногистохимический метод окраски на тирозингидроксилазу (ТН), который показал высокую надежность [24]. Для идентификации общего числа тел нейронов в VTA в работе использовали метод окрашивания нервной ткани по Нисслю с применением красителя толуидиновый синий (“Биовитрум”, Россия) [25].

#### *Поведенческие тесты*

Для выявления различий в поведении между взрослым потомством крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД или МОД, использовали общепринятые тесты для оценки уровня тревожности (тест открытого поля, светотемного выбора и приподнятого крестообразного лабиринта) и депрессивности (тест принудительного плавания). В течение 5 дней до начала поведенческого тестирования животных адаптировали к таким экспериментальным процедурам, как хэндлинг, посадка в переносной ящик, транспортировка из вивария в экспериментальную комнату и обратно, чтобы уменьшить их анксиогенное влияние на поведение животных в тестах [3, 6].

#### *Тесты для оценки уровня тревожности*

**Тест свето-темного выбора (Light-dark choice test).** Установка для проведения теста свето-темного выбора представляла собой закрытую металлическую камеру, разделенную на два сообщающихся отсека: большой (36 × 18 см) освещенный (100 лк) и малый (18 × 17 см) темный (<5 лк). Время тестирования – 5 мин. Крысу помещали в светлую часть камеры хвостом ко входу в темный отсек и регистрировали латентный период захода в темный отсек, время нахождения в светлом и темном отсеке, число переходов между отсеками, число “оценок риска” (выглядывание крысы из темного отсека в светлый) и число стоек в светлом отсеке. Считается, что чем выше тревожность, тем меньше время пребывания в светлом отсеке, число

переходов из одного отсека в другой и тем больше число “оценок риска”, и наоборот [6].

**Тест Открытого поля (Open-field test).** Установка для проведения теста “Открытое поле” – круглая арена ( $d = 90$  см), ограниченная стенкой ( $h = 30$  см). “Открытое поле” было разделено на 32 квадрата, 4 центральных квадрата считали “центром” поля. Освещенность “поля” убывала от центра (80 лк) к стенкам (20 лк) арены. Время тестирования – 5 мин. Крысу помещали в центр поля, и регистрировали следующие показатели: латентный период достижения стенок арены (с), число пересеченных квадратов (двигательная активность), число выходов в центр “поля”, число стоек (с опорой и без опоры) и число реакций груминга (короткие – менее 5 с и длительные – более 5 с), а также число болюсов. Текущее поведение животного в тесте “Открытое поле” определяется соотношением между двумя мотивациями: исследовательской мотивации, вызываемой новизной обстановки, и мотивации страха (тревоги), вызываемой умеренным стрессогенным воздействием – открытое, хорошо освещенное пространство. Принято считать, что чем больше число выходов в центр “поля” и число стоек без опоры (осуществляются животными в более “опасной” части арены – ближе к ее центру), тем выше исследовательская мотивация животного [26]. Более низкая активность в тесте открытого поля обычно считается показателем более высокого уровня тревожности, и наоборот [6].

**Приподнятый крестообразный лабиринт (Elevated plus-maze test).** Установка для проведения теста “Приподнятый крестообразный лабиринт” представляет собой конструкцию из перекрещенных пар рукавов – двух закрытых (безопасная зона) и двух открытых (расцениваются животным как потенциально-опасные места). Длина каждого рукава составляет 50 см, ширина – 15 см, место перекреста рукавов образует открытую площадку в форме квадрата со стороной 15 см. Животное помещается на пересечении закрытых и открытых рукавов – в центр лабиринта. Регистрируют следующие показатели: латентный период захода в закрытые рукава лабиринта, время, проведенное в открытых и закрытых рукавах, число переходов между рукавами лабиринта, число “оценок риска” (выглядывание или частичный выход из закрытого рукава в открытый), число стоек и реакций груминга, число свешиваний (заглядываний вниз с открытых рукавов лабиринта). Время тестирования – 3 мин [3, 27].

#### *Тест для оценки уровня депрессивности*

**Тест принудительного (вынужденного) плавания (Forced swimming test).** Тест принудительного плавания – один из наиболее часто используемых тестов для оценки антидепрессантной активности фармакологических препаратов и для определения уровня депрессивности у животных. Тестирование проводили в цилиндрическом пластмассовом баке ( $h = 47$  см,  $d_{\text{внутр.}} = 38$  см), заполненном водой на высоту 38 см. Температуру воды поддерживали на уровне  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Время тестирования – 5 мин. Крысу помещали в воду и регистрировали латентный период 1-го эпизода активного плавания, длительность 1-го эпизода активного плавания (climbing), время иммобильности (immobility), число ныряний (diving) и время плавания (swimming) – общее время активного плавания, за исключением длительности 1-го эпизода активного плавания. Чем меньше время плавания и длительность 1-го эпизода активного плавания, и чем больше время иммобильности, тем выше уровень депрессивности, и наоборот [6].

*Транскардиальная перфузия и получение образцов мозга*

Через 60 мин после окончания поведенческих тестов крыс анестезировали введением наркоза (4%-ный раствор хлоралгидрата) и фиксировали мозг транскардиальной перфузией: вводили промывающий и фиксирующий растворы через левый желудочек сердца со сливом через надрез в правом предсердии. Растворы на одно животное: для промывки — 100 мл 0.9%-ного физиологического раствора (NaCl) с добавлением 20 мкл гепарина (0.02%-ный раствор); для фиксации — 300 мл 4%-ного раствора параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере. После перфузии проводили декапитацию. На следующий день мозг извлекали из черепной коробки и помещали в 4%-ный раствор параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере. Образцы хранили при  $-4^{\circ}\text{C}$ . Перед заморозкой образцов их помещали в 20%-ный раствор сахарозы в 0.1 М фосфатном буфере. На следующий день мозг замораживали в парах жидкого азота.

*Изготовление срезов и иммуногистохимическая окраска на ТН*

Фронтальные срезы мозга толщиной 18 мкм изготавливали с помощью криостата MICROM HM 505E (Германия). Срезы монтировали на предметное стекло, покрытое 0.5%-ным раствором желатина с добавлением 0.1 г  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , таким образом, чтобы на одном стекле оказались срезы мозга крыс, принадлежащих разным экспериментальным группам. После изготовления срезов начинали процедуру иммуногистохимического окрашивания на ТН. С этой целью использовали следующие растворы и реактивы: 0.1 М раствор PBS — Phosphate buffered saline tablet (P4417-100TAB, Sigma, США). Для изготовления раствора использовали таблетки, которые, согласно инструкции производителя, растворяли исходя из расчета 1 таблетка соли на 200 мл дистиллированной воды.

Использовали следующие реактива: бычий сывороточный альбумин (BSA.0025, Диа-М, Россия); Тритон X-100 (194854, MP Biomedicals); первичные кроличьи антитела к ТН (ab 112, Abcam, США). В исследовании использовалось разведение 1 : 200. Набор для иммуногистохимической детекции HRP/DAB антител кролика (ABC-Kit, ab64261, Abcam, США), в котором использовались биотинилированные козы антитела к антителам кролика (Biotinylated Goat Anti-Rabbit), стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена (Streptavidin Peroxidase), концентрированный раствор DAB ( $50\times$  DAB Chromogen), субстрат для DAB (DAB Substrate), блокирующий раствор: 10 мл PBS, в который добавляли 0.3 г BSA и 30 мкл тритона X-100. Раствор для разведения первичных антител содержал 10 мл PBS, в который добавляли 0.1 г BSA и 10 мкл тритона X-100.

Вся процедура окрашивания на ТН проходила при комнатной температуре и состояла в следующем: срезы в течение 30 мин инкубировали в блокирующем растворе при комнатной температуре. На срезы наносили 100 мкл первичных антител в разведении 1 : 200, стекла накрывали парафином и помещали во влажную камеру на ночь, на следующий день срезы трижды промывали PBS и инкубировали с PBS в течение 30 мин. На стекла наносили вторичные антитела (Biotinylated Goat Anti-Rabbit) и инкубировали в течение 10 мин. Далее срезы 4 раза промывали PBS, наносили стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена (Streptavidin Peroxidase) и инкубировали в течение 10 мин. После инкубации срезы 4 раза промывали PBS и наносили DAB. С этой целью перед употреблением концентрат DAB (1 капля) растворяли в 50 каплях субстрата для DAB (DAB Substrate). Срезы инкубировали в течение 10 мин под визуальным контролем, затем промывали в дистиллированной воде и заключали в глицерин под покрывное стекло.

### *Фотографирование срезов и подсчет числа DA-ергических нейронов*

Срезы с VTA фотографировали с помощью камеры ThorCam, установленной на микроскоп AxioPlan 2 (Карл Цейс, Германия), при увеличении  $\times 100$ .

Подсчет числа DA-ергических (TH-иммунопозитивных клеток) проводили в каждом полушарии в отдельности. Анализировали 5 срезов с каждого образца головного мозга у каждой крысы. Подсчет числа нейронов в методе окраски по Нисслю проводили на фотографиях, сделанных при увеличении  $\times 400$ . Поле зрения площадью  $0.09 \text{ мм}^2$  было поделено на 4 квадрата (площадь каждого из них —  $0.0225 \text{ мм}^2$ ), в которых и проводили подсчет. На каждом стекле находилось по 4 среза мозга (по одному срезу из каждой группы).

Данные в тексте представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. На рисунке данные представлены в виде точек, каждая из которых означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы.

### *Методика окрашивания нервной ткани по Нисслю*

Фронтальные срезы мозга толщиной 20 мкм изготавливали с помощью криостата (HM 505 Carl Zeiss, Германия). Срезы монтировали на предметное стекло. Для окраски по Нисслю использовали краситель толуидиновый синий (“Бiovитрум”, Россия). С этой целью срезы инкубировали в красителе в течение 1–2 мин, затем их ополаскивали в дистиллированной воде и 70%-ном спирте (в течение 2–5 мин). Срезы дифференцировали в 96%-ном спирте, проводили через 100%-ный спирт, толуол и заключали в смолу (витрогель, “Бiovитрум”, Россия) под покровное стекло. Фотографии срезов делали с помощью камеры (ThorLabs, США) при увеличении  $\times 400$  (микроскоп AxioPlan 2, Carl Zeiss, Германия). Число нейронов в методе окраски по Нисслю анализировали в отдельных полях зрения. На каждом стекле находилось по 4 среза мозга (по одному срезу из каждой группы).

Определяли число нейронов, у которых срез прошел через ядро и ядрышко ядра сателлитной глии, удаленной от нейрона на расстояние, не превышающее диаметр ядра глиальной клетки; ядра свободной глии, удаленной от нейрона на расстояние, превышающее диаметр ядра глиальной клетки.

### *Статистический анализ данных*

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета статистических программ “STATISTICA 6.0”. Для оценки фактора “диета матери” и фактора “поведенческое тестирование” при оценке числа нейронов (окраска по Нисслю) и числа TH-иммунопозитивных клеток (иммуногистохимическое окрашивание) в правом и левом полушарии мозга использовали двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями (two-way ANOVA with repeated measures). Для сравнения различий поведенческих показателей между группами крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД и КД, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Для всех исследованных поведенческих показателей определяли наличие выбросов по критерию Граббса (Grubbs’ test). Определение различий между средними значениями показателей проводили по post-hoc критерию Ньюмена–Кеулса (Newman–Keuls test). Результаты ANOVA контролировали с использованием непараметрического аналога ANOVA — Kruskal–Wallis H test (one-way ANOVA by ranks) и критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Существование связи между числом TH-иммунопозитивных клеток и длительностью 1-го эпизода активного плавания, а также между числом TH-иммунопозитивных клеток и числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного

**Таблица 1.** Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте свето-темнового выбора

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Латентный период захода в темный отсек, с	15.2 ± 5.7	19.0 ± 5.7
Время нахождения в светлом отсеке камеры, с	67.2 ± 13.5	71.0 ± 13.5
Число переходов между отсеками	5.4 ± 1.7	5.8 ± 1.7
Число оценок “риска”	4.6 ± 1.4	5.8 ± 1.4
Число стоек в светлом отсеке	1.6 ± 0.3	2.8 ± 0.3

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

**Таблица 2.** Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте “Открытое поле”

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Число пересеченных квадратов	48.0 ± 7.6	45.4 ± 7.6
Число выходов в центр “поля”	<b>0.2 ± 0.4</b>	<b>2.4 ± 0.4*</b>
Число стоек с опорой	<b>2.2 ± 1.4</b>	<b>5.2 ± 1.4<sup>#</sup></b>
Число стоек без опоры	3.4 ± 1.1	6.8 ± 1.1
Число коротких реакций груминга	2.2 ± 1.2	4.8 ± 1.2
Число длительных реакций груминга	2.6 ± 1.2	2.2 ± 1.2

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

\* –  $p < 0.05$ . <sup>#</sup> –  $0.05 < p < 0.1$  (тенденция). Значимые изменения выделены затемнением.

лабиринта, определяли по коэффициенту корреляции Пирсона. Ввиду малого размера выборки в работе приведены только те корреляции, у которых критерий корреляции Пирсона  $r_{xy} \geq 0.69$  (сила корреляционной связи интерпретировалась как высокая/весьма высокая).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В тесте свето-темнового выбора у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с контрольными крысами не наблюдали значимых отличий в поведении по всем исследованным показателям, оценивающим уровень тревожности (латентный период захода в темный отсек камеры, время нахождения в светлом отсеке камеры, число переходов между отсеками, число стоек в светлом отсеке и число оценок “риска”) (табл. 1).

В тесте “Открытое поле” у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij число выходов в центр “поля” было значимо больше ( $F_{(1, 8)} = 7.2$ ,  $p = 0.03$ ), чем у контрольной группы. У крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было также больше число стоек с опорой по сравнению с контрольной группой. Однако это различие не достигало уровня статистической значимости ( $F_{(1, 8)} = 4.4$ ,  $p = 0.06$ ). По остальным исследованным показателям различий между экспериментальной и контрольной группой крыс линии WAG/Rij не наблюдалось (табл. 2).

В тесте приподнятого крестообразного лабиринта у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с крысами, рожденными матерями, потреблявшими КД, не наблюдали значимых отличий ни по одному из исследованных показателей, таких как время нахождения в открытых и закрытых

**Таблица 3.** Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте приподнятого крестообразного лабиринта

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Время нахождения в открытых рукавах, с	12.8 ± 4.6	14.6 ± 4.6
Число переходов между рукавами	2.4 ± 0.6	3.0 ± 0.6
Число стоек в закрытых рукавах	5.0 ± 0.8	5.4 ± 0.8
Число стоек в открытых рукавах	0.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3
Число реакций груминга в закрытых рукавах	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.6
Число свешиваний	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2

Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

**Таблица 4.** Показатели поведения у крыс линии WAG/Rij в тесте принудительного плавания

Показатели поведения	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими КД	Потомство крыс линии WAG/Rij, рожденное матерями, потреблявшими МОД
Латентный период активного плавания, с	12.8 ± 3.7	10.4 ± 3.7
Длительность 1-го эпизода активного плавания, с	<b>85.2 ± 8.9</b>	<b>128.8 ± 8.9**</b>
Время плавания, с	<b>48.4 ± 6.4</b>	<b>67.0 ± 6.4*</b>
Время иммобильности, с	<b>154.2 ± 10.1</b>	<b>120.8 ± 10.1<sup>#</sup></b>
Число ныряний	<b>2.0 ± 0.6</b>	<b>6.0 ± 0.6**</b>

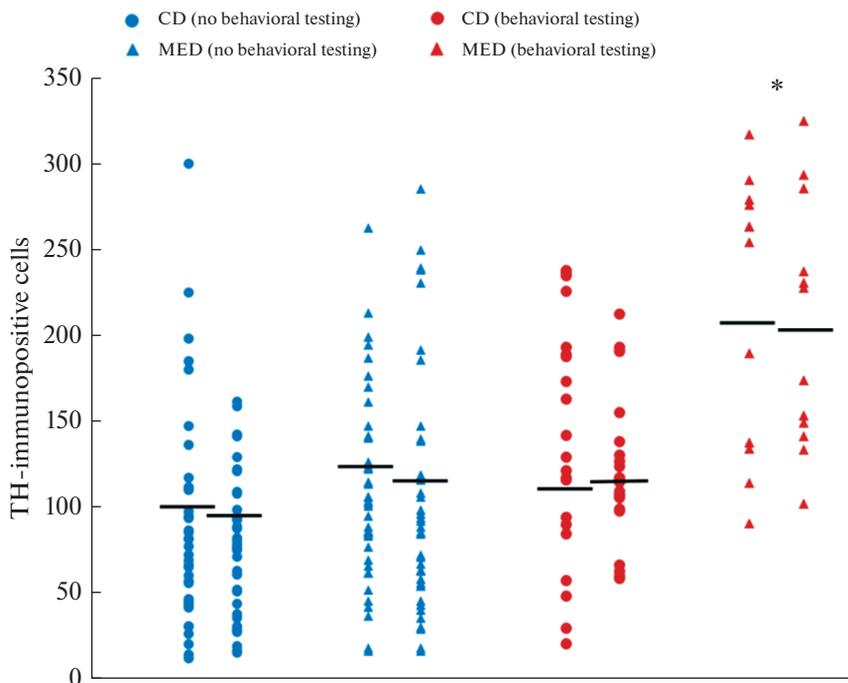
Для каждого показателя приведены средние значения и ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

\*\* –  $p < 0.01$ , \* –  $p = 0.05$ , <sup>#</sup>  $0.05 < p < 0.1$ . Остальные обозначения как в табл. 2.

рукавах лабиринта, число переходов между рукавами, число стоек и реакций груминга в открытых и закрытых рукавах лабиринта, число свешиваний с открытых рукавов (табл. 3).

В тесте принудительного плавания у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij длительность 1-го эпизода активного плавания ( $F_{(1, 8)} = 12.0, p < 0.01$ ), длительность плавания ( $F_{(1, 8)} = 5.4, p = 0.05$ ) и число ныряний ( $F_{(1, 8)} = 22.9, p = 0.001$ ) были значимо больше, а длительность иммобильности ( $F_{(1, 8)} = 4.2, p = 0.07$ ) была меньше (на уровне тенденции) по сравнению с аналогичными показателями у контрольной группы крыс линии WAG/Rij (табл. 4).

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что факторы “диета матери” ( $F_{(1, 105)} = 19.0, p < 0.001$ ), “поведенческое тестирование” ( $F_{(1, 105)} = 9.02, p < 0.01$ ), а также взаимодействие этих факторов ( $F_{(1, 105)} = 4.5, p < 0.05$ ) оказывают статистически значимое влияние на число ДА-ергических нейронов, которое определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток. Фактор “полушарие мозга” был незначимым ( $F_{(1, 105)} = 1.0, p = 0.3$ ). Число ТН-иммунопозитивных клеток в правом и левом полушарии мозга статистически значимо не различалось в правом и левом полушариях мозга ни у одной из исследованных групп крыс. Так, межполушарные различия в числе ДА-ергических нейронов отсутствовали у потомства крыс, рожденных матерями, потреблявшими МОД (экспериментальная группа), которые подвергались поведенческому тестированию ( $186.2 \pm 16.1$  – правое полушарие и  $186.4 \pm 16.5$  – левое полушарие,  $p = 0.9$ ) и не подвергались поведенческому тестированию ( $123.4 \pm 9.4$  – правое полушарие и  $128.9 \pm 9.7$  – левое полушарие,  $p = 0.5$ ). Статистически значимых межполушарных различий также не было выявлено у потом-

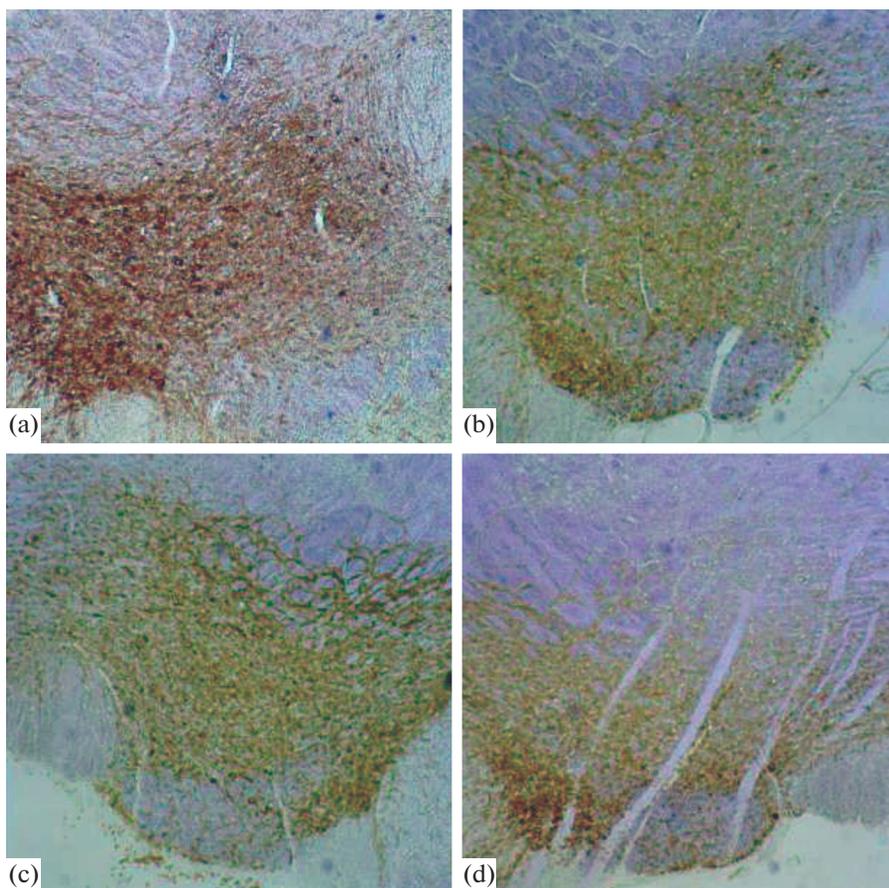


**Рис. 1.** Число ТН-иммунопозитивных клеток (ТН-immunopositive cells) в VTA у крыс линии WAG/Rij. КД (CD) – контрольная диета, МОД (MED) – метилобогатая диета. \* $p < 0.05$  – у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и подвергнутых поведенческому тестированию по сравнению с остальными группами крыс. Каждая точка означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы. Слева – левое полушарие. Справа – правое полушарие. Горизонтальные линии – средние значения показателей в каждой группе.

ства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими КД, которые подвергались ( $108.0 \pm 12.6$  – правое полушарие и  $113.1 \pm 12.9$  – левое полушарие,  $p = 0.5$ ) и не подвергались ( $97.2 \pm 9.5$  – правое полушарие и  $102.3 \pm 9.8$  – левое полушарие,  $p = 0.5$ ) поведенческому тестированию (рис. 1). Число DA-ергических нейронов в VTA было статистически значимо больше только у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, и подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению как с потомством крыс линии WAG/Rij контрольной группы, и подвергнутых поведенческому тестированию ( $p < 0.05$  – правое и левое полушарие), так и с потомством крыс линии WAG/Rij экспериментальной группы, и не подвергнутых поведенческому тестированию ( $p < 0.05$  – правое и левое полушарие).

На рис. 2 показаны микрофотографии срезов мозга крыс линии WAG/Rij, окрашенные на ТН. Можно видеть, что наибольшее число ТН-иммунопозитивных клеток у крысы линии WAG/Rij, рожденной матерью, потреблявшей МОД во время перинатального периода, и подвергнутой поведенческому тестированию (рис. 2а).

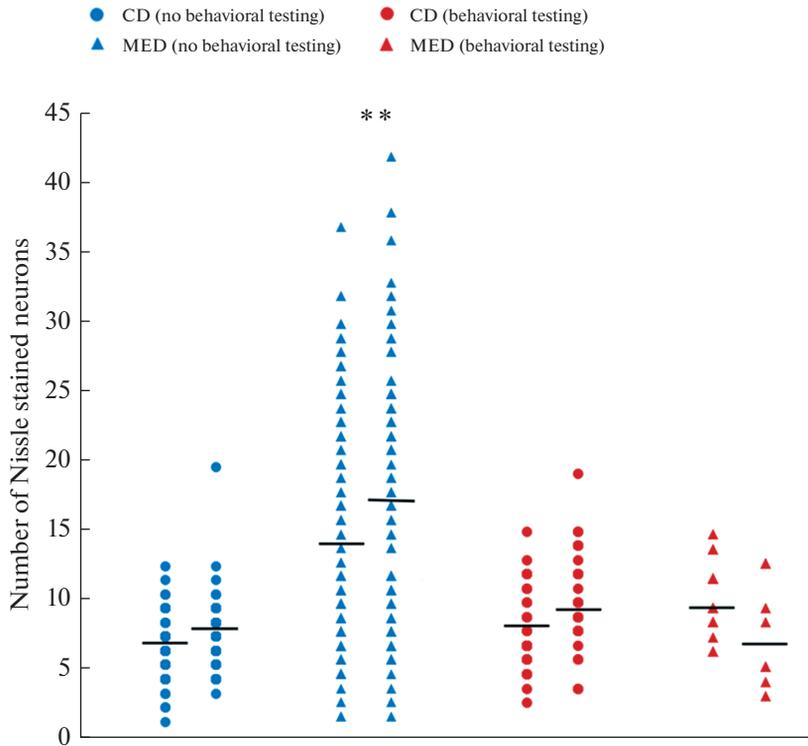
Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что факторы “диета матери” ( $F_{(1, 127)} = 16.4, p < 0.001$ ) и “поведенческое тестирование” ( $F_{(1, 127)} = 4.3, p < 0.05$ ) оказывают статистически значимое влияние на число нейронов, окрашенных по методу Ниссля, в области VTA. Число нейронов у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было больше по сравнению с крысами контрольной



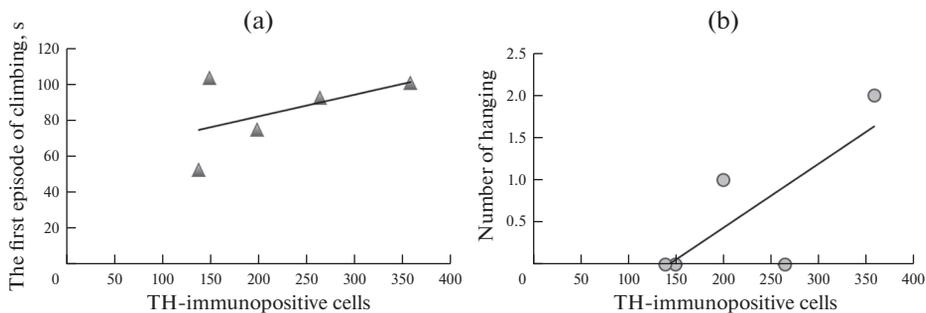
**Рис. 2.** Микрофотографии срезов мозга 6-месячных крыс линии WAG/Rij, иллюстрирующие TH-иммунопозитивные клетки на уровне VTA. (a) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей МОД, и подвергнутой поведенческому тестированию; (b) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей МОД, и не подвергнутой поведенческому тестированию; (c) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей КД, и подвергнутой поведенческому тестированию; (d) у крысы, рожденной матерью, потреблявшей КД, и не подвергнутой поведенческому тестированию. Ув.  $\times 100$ .

ной группы как в левом ( $13.6 \pm 0.6$  – МОД и  $6.1 \pm 0.8$  – КД,  $p < 0.01$ ) (рис. 3), так и в правом полушарии ( $15.0 \pm 0.6$  – МОД и  $6.8 \pm 0.8$  – КД,  $p < 0.01$ ) мозга (рис. 3). В группе, которая подвергалась поведенческому тестированию, не наблюдалось статистически значимых различий по данному показателю между животными экспериментальной и контрольной группы в левом ( $8.6 \pm 1.6$  – МОД и  $7.1 \pm 1.1$  – КД,  $p = 0.7$ ) и правом ( $8.3 \pm 1.6$  – МОД и  $9.1 \pm 1.2$  – КД,  $p = 0.9$ ) полушарии мозга (рис. 3). Межполушарных различий по числу нейронов в области VTA не обнаружено ни в одной из исследованных групп животных.

Длительность первого эпизода активного плавания ( $r = 0.69$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 4a) и число свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта ( $r = 0.77$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 4b) у крыс линии WAG/Rij положительно коррелировало с числом TH-иммунопозитивных клеток.



**Рис. 3.** Число нейронов, окрашенных по Нисслю (the number of Nissl-stained neurons) на уровне VTA, у крыс линии WAG/Rij. КД (CD) – контрольная диета, МОД (MED) – метилобогатая диета. \*\*\*  $p < 0.01$  – у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД и не подвергнутых поведенческому тестированию, по сравнению с остальными группами крыс. Каждая точка означает индивидуальное значение для иллюстрации вариабельности внутри каждой группы. Слева – левое полушарие. Справа – правое полушарие. Горизонтальные линии – средние значения показателей в каждой группе.



**Рис. 4.** Связь между длительностью первого эпизода активного плавания (the first episode of climbing, s) и числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта (number of hanging) и числом ТН-иммунопозитивных клеток (TH-immunopositive cells) у крыс линии WAG/Rij. По оси абсцисс – число ТН-иммунопозитивных клеток, по оси ординат – длительность первого эпизода активного плавания (а) и число свешиваний (б). Коэффициенты корреляции Пирсона: (а) –  $r = 0.69, p < 0.05$ ; (б) –  $r = 0.77, p < 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные в настоящей работе, указывают на более низкое проявление симптомов депрессии у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД. У экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij в тесте принудительного плавания длительность 1-го эпизода активного плавания, длительность плавания и число ныряний были значимо больше, а время иммобильности — меньше (тенденция) по сравнению с контрольной группой крыс данной линии. Кроме того, в тесте “Открытое поле” у экспериментальной группы крыс линии WAG/Rij число выходов в центр “поля” было значимо больше, чем у контрольной группы. Число выходов в центр является показателем исследовательской мотивации, обычно пониженной при депрессии [26]. С этими данными согласуются результаты ранее проведенного нами исследования [12, 13], в котором было показано, что МОД матери в перинатальном периоде может уменьшить проявления депрессии, коморбидной абсанс-эпилепсии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Показано, что длительность иммобильности была меньше, а длительность 1-го эпизода активного плавания, число ныряний (тест принудительного плавания), а также предпочтение раствора сахарозы (тест потребления сахарозы) были больше у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, по сравнению с потомством, матери которых потребляли КД [12, 13]. Симптомы как абсанс-эпилепсии, так и депрессии являются ДА-зависимыми. Так, снижение активности ДА-ергической системы мозга вызывает усиление пик-волновой активности у крыс линии WAG/Rij [3] и крыс линии GAERS [4, 5]. Острое введение селективного антагониста ДА-ергических D2/D3-рецепторов раклоприда усугубляло симптомы депрессивно-подобного поведения и подавляло антидепрессантный эффект хронического введения имипрамина [6]. Выявлена также гипофункция мезолимбической ДА-ергической системы мозга — более низкая концентрации ДА в прилежащем ядре у крыс линии WAG/Rij (снижение ДА-ергического тонуса) по сравнению с крысами Wistar без патологии [7, 8]. В нашей предыдущей работе у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими МОД, был продемонстрирован более высокий ДА-ергический тонус [22] и более высокий уровень экспрессии генов, в том числе гена TH в прилежащем ядре [13] по сравнению с потомством крыс линии WAG/Rij, рожденного матерями, потреблявшими КД.

Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов на уровне VTA показывают, что у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, число TH-иммунопозитивных клеток (ДА-ергических нейронов) в области VTA было больше по сравнению с крысами контрольной группы. Имеется целый ряд данных, свидетельствующих о высокой чувствительности VTA к эпигенетическим факторам различной природы, что может проявляться изменением числа клеток, составляющих данную область головного мозга, или их более высокой активности. Так, на модели пентилентетразолового киндлинга у мышей показана сниженная по сравнению с животными контрольной группы активность ДА-ергических нейронов в VTA в ответ на новизну [28]. Материнская забота, когда крыса-мать усиленно вылизывает и проявляет заботу о детенышах, увеличивает число TH-иммунопозитивных клеток VTA на 6-й постнатальный день, и положительный эффект материнской заботы на число ДА-ергических нейронов сохранялся также у взрослого потомства [29]. Ссаживание самок с самцами в течение 1 недели приводило к увеличению TH-иммунопозитивных клеток в VTA примерно на 12% у самцов; содержание самцов в домашней клетке с обогащенной средой также приводило к 14%-му увеличению TH-иммунопозитивных клеток VTA [30].

Различие в числе ДА-ергических нейронов в VTA у крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, достигало уровня статистической значимости только у той группы животных, которая подвергалась поведенческому тестированию ( $p < 0.05$  – для правого и левого полушария мозга). ДА-ергические нейроны мы определяли по числу ТН-иммунопозитивных клеток, усиленно продуцирующих ТН. ТН обеспечивает как базальный уровень дофамина, так и необходимое изменение его содержания при действии различных эндо- и экзогенных стимулов [31]. К числу экзогенных воздействий можно отнести проведенное поведенческое тестирование. Хорошо известно, что активность ДА-ергических нейронов VTA связана с движением. Например, мыши, помещенные в цилиндрический сосуд с водой, значительно увеличивали число плавательных движений в единицу времени при оптогенетической стимуляции ДА-ергических нейронов VTA [32]. Повышение продукции ТН в ДА-ергических нейронах, вероятно, обеспечивает более высокую выявляемость ТН-иммунопозитивных клеток у потомства крыс линии WAG/Rij, подвергнутого как поведенческому тестированию, так и воздействию МОД матери (по сравнению со всеми остальными группами крыс).

Результаты окрашивания срезов по Нисслю в области VTA подтверждают результаты иммуногистохимического окрашивания срезов на уровне VTA: число нейронов в области VTA у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, было больше по сравнению с потомством той же линии, рожденных матерями, потреблявшими КД. Однако это различие было значимым только в группе, не подвергавшейся поведенческому тестированию. Метод окрашивания срезов по Нисслю позволяет обнаружить на срезе нейроны, выявляя специфичный для данных клеток нуклеопротеидный комплекс (тигроид), при этом, однако, невозможно выявить нейротрансмиттерную специфичность выявляемых нейронов в поле зрения исследователя и подсчитать их количество [25]. VTA представляет собой гетерогенную область, которая включает в себя множество нейронов, характеризующихся различными нейрохимическими и нейрофизиологическими свойствами. Установлено, что примерно 55–65% нейронов VTA – это ДА-ергические нейроны. Кроме того, VTA содержит также значительное число ГАМК-ергических нейронов, вырабатывающих тормозный нейромедиатор ГАМК [33]. Кроме того, эксперименты на грызунах выявили мезохабенулярный путь, состоящий из аксонов нейронов VTA, которые выделяют, помимо дофамина и ГАМК, возбуждающий нейромедиатор глутамат [34]. Таким образом, результаты, полученные в нашей работе, могут быть объяснены тем, что в отсутствие активации животных поведенческим тестированием, материнская МОД способствует увеличению числа как ДА-ергических нейронов, так и не-ДА-ергических нейронов VTA, которые, тем не менее, модулируют работу ДА-ергических нейронов. И только суммарное воздействие МОД матери (обеспечивает повышение числа выявляемых, в том числе ДА-ергических, нейронов) и поведенческого тестирования (обеспечивает повышение продукции ТН в ДА-ергических нейронах) приводит к статистически значимым различиям числа ДА-ергических нейронов у крыс линии WAG/Rij, подвергнутого как поведенческому тестированию, так и воздействию МОД матери (по сравнению со всеми остальными группами крыс).

Увеличение числа ДА-ергических нейронов в VTA, то есть в области мозга, которая содержит тела нейронов мезолимбического ДА-ергического пути, вероятнее всего, влечет за собой увеличение концентрации ДА в прилежащем ядре – конечной структуре мезолимбической системы, получающей ДА-ергические терминали из VTA [23], что приводит к повышению ДА-ергического тонуса мозга [8, 22]. Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, согласуются с предположением о том, что в основе уменьшения симптомов депрессивно-подобного поведения лежит повышение ДА-ергического тонуса у потомства крыс линии WAG/Rij,

рожденных матерями, потреблявшими МОД. Это предположение подтверждается, в том числе, данными корреляционного анализа: обнаружены значимые положительные корреляции между числом ТН-иммунопозитивных клеток и длительностью первого эпизода активного плавания ( $r = 0.69, p < 0.05$ ) (рис. 4а), а также числом свешиваний с открытых рукавов приподнятого крестообразного лабиринта ( $r = 0.77, p < 0.05$ ) (рис. 4б).

В настоящее время морфологические и функциональные расстройства трансмиссии ДА в головном мозге рассматривают как одну из основных причин развития депрессии. Некоторые виды депрессии сопровождаются потерей ДА-ергических нейронов, а возрастные депрессивные расстройства можно прямо объяснить с позиций гибели ДА-ергических нейронов головного мозга [35]. Интересно, что у крыс линии WAG/Rij в возрасте 2-х месяцев отсутствуют фенотипические проявления абсанс-эпилепсии [36] и депрессии [37]; снижения ДА-ергического тонуса (уменьшения содержания ДА в прилежащем ядре) в этом возрасте также не наблюдается [37]. В возрасте 6-ти месяцев пик-волновая активность [3, 36] и симптомы депрессии [3, 6] хорошо выражены, и сопровождаются снижением ДА-ергического тонуса [7, 8]. Наиболее вероятная причина – уменьшение сохранности ДА-ергических нейронов мезолимбической ДА-ергической системы. Можно предположить, что одним из возможных механизмов сниженного числа ДА-ергических нейронов в VTA, приводящих к формированию поведенческих симптомов депрессии у крыс линии WAG/Rij, может быть недостаточность нейротрофических факторов. Одним из эндогенных нейротрофических факторов, специфичных для ДА-ергической системы и рассматривающихся как мощный терапевтический агент, является глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) [38].

GDNF способствует дифференцировке и выживанию ДА-ергических нейронов путем увеличения экспрессии ТН и других необходимых белков, включая белок, связанный с ядерным рецептором-1 (Nuclear receptor related-1 protein, Nurr1) [39]. GDNF может значительно увеличить квант выброса ДА из синаптических терминалей [40]. Введение GDNF в ДА-ергические нейроны крыс, выделенные из VTA, приводит к увеличению возбуждающих синапсов, и тем самым способствует высвобождению ДА из терминалей. Одна из возможностей заключается в том, что GDNF может способствовать росту локальных возбуждающих синаптических входов к структурам мозга, богатым ДА-ергическими нейронами [41]. Nurr1 играет роль фактора транскрипции на ранних этапах дифференцировки ДА-ергических нейронов среднего мозга, однако он продолжает экспрессироваться во взрослом возрасте. Экспрессия Nurr1 обычно снижается при болезни Паркинсона, и в некоторых случаях заболевания были выявлены мутации в гене этого белка. Дефицит Nurr1 в созревающих ДА-ергических нейронах приводил к быстрому истощению запасов ДА и дегенерации ДА-ергических нейронов в стриатуме [42].

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что материнская МОД во время перинатального периода увеличивает число ДА-ергических (ТН-иммунопозитивных) нейронов в VTA у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что уменьшение симптомов депрессивно-подобного поведения у потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, потреблявшими МОД, происходит вследствие благоприятного воздействия МОД на развитие мезолимбической ДА-ергической системы мозга. МОД матери во время перинатального периода вызывает увеличение числа ДА-синтезирующих нейронов в VTA и вследствие этого повышение ДА-ергического тонуса мозга.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проведено в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г. — Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН о работе с экспериментальными животными. Экспериментальные протоколы утверждены этической комиссией Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (протокол № 5 от 02.12.2020 г.).

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-15-00327а).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (К.Ю.С., Н.А.Л.); постановка экспериментов, сбор данных (Е.А.Ф., Н.А.Л.); обработка данных (Е.А.Ф., К.Ю.С.); написание и редактирование рукописи (Е.А.Ф., К.Ю.С.).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность лаборанту Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН Н.В. Панову за проведение транскардиальной перфузии и осуществление предварительной подготовки мозга для дальнейших иммуногистохимических исследований.

Авторы также выражают особую признательность м.н.с. Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН А.Б. Шацковой за помощь при проведении начальных этапов эксперимента для получения потомства крыс линии WAG/Rij, рожденных матерями, которых кормили метилобогатой или контрольной диетой для последующих иммуногистохимических исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Саркисова КЮ, Куликов МА* (2000) Новая экспериментальная модель депрессии: крысы линии WAG/Rij, генетически предрасположенные к absence-эпилепсии. ДАН 374(5): 706–709. [*Sarkisova KY, Kulikov MA* (2000) A new experimental model of depression: WAG/Rij rats genetically predisposed to absence epilepsy. Dokl Biol Sci 374(5): 706–709. (In Russ)].
2. *Sarkisova KY, Midzyanovskaya IS, Kulikov MA* (2003) Depressive-like behavioral alterations and c-fos expression in the dopaminergic brain regions in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Behav Brain Res 144: 211–226. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(03\)00090-1](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(03)00090-1)
3. *Sarkisova K, van Luijteleaer G* (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(4): 854–876. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.11.010>
4. *Deransart C, Riban V, Lê B, Marescaux C, Depaulis A* (2000) Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat. Neuroscience 100(2): 335–344. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00266-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00266-9)
5. *Tugba EK, Medine GIO, Ozlem A, Deniz K, Filiz OY* (2022) Prolongation of absence seizures and changes in serotonergic and dopaminergic neurotransmission by nigrostriatal pathway degeneration in genetic absence epilepsy rats. Pharmacol Biochem Behav 213: 173317. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173317>
6. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Midzyanovskaia IS, Folomkina AA* (2007) Dopamine-dependent character of depressive-like behavior in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. Zh Vyssh

- Nerv Deiat Im IP Pavlova 57(1): 91–102.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-008-0017-z>
7. *Sarkisova KYu, Kulikov MA, Kudrin VS, Narkevich VB, Midzianovskaia IS, Biriukova LM, Folomkina AA, Basian AS* (2014) Neurochemical mechanisms of depression-like behavior in WAG/Rij rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 63(3): 303–315.  
<https://doi.org/10.7868/s0044467713030106>
  8. *Sarkisova KJu, Kulikov MA, Kudrin VS, Midzhanovskaya IS, Birioukova LM* (2014) Age-related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 64(6): 668–685.  
<https://doi.org/10.7868/S0044467714060094>
  9. *Sarkisova KY, Gabova AV, Kulikov MA, Fedosova EA, Shatskova AB, Morosov AA* (2017) Rearing by foster Wistar mother with high level of maternal care counteracts the development of genetic absence epilepsy and comorbid depression in WAG/Rij rats. *Dokl Biol Sci* 473(1): 39–42.  
<https://doi.org/10.1134/S0012496617020077>
  10. *Sarkisova KY, Gabova AV* (2018) Maternal care exerts disease-modifying effects on genetic absence epilepsy and comorbid depression. *Genes Brain Behav* 17(7): e12477.  
<https://doi.org/10.1111/gbb.12477>
  11. *Sarkisova K, van Luijckelaar G* (2022) The impact of early-life environment on absence epilepsy and neuropsychiatric comorbidities. *IBRO Neurosci Rep* 13: 436–468.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.10.012>
  12. *Sarkisova KY, Gabova AV, Fedosova EA, Shatskova AB* (2020) Gender-Dependent Effect of Maternal Methyl-Enriched Diet on the Expression of Genetic Absence Epilepsy and Comorbid Depression in Adult Offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 494(1): 244–247.  
<https://doi.org/10.1134/S0012496620050075>
  13. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Rudenok MM, Stanishevskaya VA, Slominsky PA* (2023) Maternal Methyl-Enriched Diet Increases DNMT1, HCN1, and TH Gene Expression and Suppresses Absence Seizures and Comorbid Depression in Offspring of WAG/Rij Rats. *Diagnostics (Basel)* 13(3): 398.  
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13030398>
  14. *Van den Veyver IB* (2002) Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr* 22: 255–282.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932>
  15. *Herbeck YE, Gulevich RG, Amelkina OA, Plyusnina IZ, Oskina IN* (2010) Conserved methylation of the glucocorticoid receptor gene exon 1(7) promoter in rats subjected to a maternal methyl-supplemented diet. *Int J Dev Neurosci* 28(1): 9–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.10.004>
  16. *Poletaeva II, Surina NM, Ashapkin VV, Fedotova IB, Merzlov IB, Perepelkina OV, Pavlova GV* (2014) Maternal methyl-enriched diet in rat reduced the audiogenic seizure proneness in progeny. *Pharmacol Biochem Behav* 127: 21–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.09.018>
  17. *Jaenisch R, Bird A* (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245–254.  
<https://doi.org/10.1038/ng1089>
  18. *Ванюшин БФ* (2013) Эпигенетика сегодня и завтра. Вавиловск журн генетики и селекции 17 (4/2): 805–832. [*Vanyushin BF* (2013) Epigenetics today and tomorrow. Vavilovsk zhurn genetiki i seleksii 17 (4/2): 805–832. (In Russ)].
  19. *Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W* (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14(1): 47–58.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>
  20. *Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S* (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910–2917.
  21. *Tekin I, Roskoski RJr, Carkaci-Salli N, Vrana KE* (2014) Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. *J Neur Transm* 121(12): 1451–1481.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-014-1238-7>
  22. *Sarkisova KY, Fedosova EA, Shatskova AB, Narkevich VB, Kudrin VS* (2022) Maternal Methyl-Enriched Diet Increases Dopaminergic Tone of the Mesolimbic Brain System in Adult Offspring of WAG/Rij Rats. *Dokl Biol Sci* 506(1): 145–149.  
<https://doi.org/10.1134/S001249662205012X>
  23. *Trutti AC, Mulder MJ, Hommel B, Forstmann BU* (2019) Functional neuroanatomical review of the ventral tegmental area. *Neuroimage* 191: 258–268.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.01.062>
  24. *Margolis EB, Coker AR, Driscoll JR, Lemaitre AI, Fields HL* (2010) Reliability in the identification of midbrain dopamine neurons. *PLoS One* 5(12): e15222.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015222>

25. *Lapshina KV, Abramova YuYu, Guzev MA, Ekimova IV* (2022) TGN-020, Inhibitor of the Water Channel Aquaporin-4, Accelerates Nigrostriatal Neurodegeneration in the Rat Model of Parkinson's Disease. *J Evol Biochem Physiol* 58(6): 2035–2047.  
<https://doi.org/10.31857/S0869813922120081>
26. *Fedosova EA, Shatskova AB, Sarkisova KY* (2021) Ethosuximide increases exploratory motivation and improves episodic memory in the novel object recognition test in WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 51(4): 501–512.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01097-z>
27. *Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z* (2019) The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol* 1916: 69–74.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4)
28. *Ahmadi M, Dufour JP, Seifritz E, Mirnajafi-Zadeh J, Saab BJ* (2017) The PTZ kindling mouse model of epilepsy exhibits exploratory drive deficits and aberrant activity amongst VTA dopamine neurons in both familiar and novel space. *Behav Brain Res* 330: 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.025>
29. *Peña CJ, Neugut YD, Calarco CA, Champagne FA* (2014) Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring. *Eur J Neurosci* 39(6): 946–956.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12479>
30. *Tomas D, Prijanto AH, Burrows EL, Hannan AJ, Horne MK, Aumann TD* (2015) Environmental modulations of the number of midbrain dopamine neurons in adult mice. *J Vis Exp* 95: 52329.  
<https://doi.org/10.3791/52329>
31. *Sukhareva EV, Kalinina TS, Bulygina VV, Dygalo NN* (2016) Tyrosine hydroxylase of the brain and its regulation by glucocorticoids. *Vavilov J Genet Breed* 20(2): 212–219.  
<https://doi.org/10.18699/VJ16.156>
32. *Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K* (2013) Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behavior. *Nature* 493(7433): 537–541.  
<https://doi.org/10.1038/nature11740>
33. *Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S* (2012) Braking Dopamine Systems: A New GABA Master Structure for Mesolimbic and Nigrostriatal Functions. *J Neurosci* 32(41): 14094–14101.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012>
34. *Root DH, Mejias-Aponte CA, Zhang S, Wang HL, Hoffman AF, Lupica CR, Morales M* (2014) Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat Neurosci* 17(11): 1543–1551.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3823>
35. *Rollo CD* (2009) Dopamine and aging: intersecting facets. *Neurochem Res* 34(4): 601–629.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-008-9858-7>
36. *Gabova AV, Sarkisova KYu, Fedosova EA, Shatskova AB, Morozov AA* (2020) Developmental Changes in Peak-Wave Discharges in WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 50: 245–252.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-019-00893-y>
37. *Fedosova EA, Sarkisova KYu, Kudrin VS, Narkevich VB, Bazyan AS* (2015) Behavioral and Neurochemical Characteristics of Two Months Old WAG/Rij Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Int J Clin Exp Neurol* 3(2): 32–44.  
<https://doi.org/10.12691/ijcen-3-2-2>
38. *Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK* (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138(2): 155–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
39. *Cortés D, Carballo-Molina OA, Castellanos-Montiel MJ, Velasco I* (2017) The Non-Survival Effects of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor on Neural Cells. *Front Mol Neurosci* 10: 258.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00258>
40. *Roussa E, Oehlke O, Rahhal B, Heermann S, Heidrich S, Wiehle M, Krieglstein K* (2008) Transforming growth factor beta cooperates with persephin for dopaminergic phenotype induction. *Stem Cells* 26(7): 1683–1694.  
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0805>
41. *Sariola H, Saarma M* (2003) Novel functions and signaling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116(19): 3855–3862.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.00786>
42. *Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S, Sumi-Ichinose C, Nomura T, Metzger D, Chambon P, Lindqvist E, Larsson NG, Olson L, Björklund A, Ichinose H, Perlmann T* (2009) Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 29(50): 15923–15932.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3910-09.2009>

## The Effect of Maternal Methyl-Enriched Diet on the Number of Dopaminergic Neurons in the Ventral Tegmental Area in Adult Offspring of WAG/Rij Rats

E. A. Fedosova<sup>a, \*</sup>, N. A. Loginova<sup>a</sup>, and K. Yu. Sarkisova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*\*e-mail: ekaterina5fedosova@rambler.ru*

WAG/Rij rats are genetic model of absence epilepsy with comorbid depression. Pathologic phenotype in WAG/Rij rats was shown to be associated with reduced dopamine (DA) tone within the mesolimbic DAergic brain system. Previously, it was found that maternal methyl-enriched diet (MED) in the perinatal period increases DA content in the mesolimbic DAergic brain system and reduces absence seizures and comorbid depression in adult offspring of WAG/Rij rats. Ventral tegmental area (VTA), containing DA cells bodies, is a main source of the mesolimbic DA synthesis. The aim of this study was to test the hypothesis that increases in the mesolimbic DAergic tone induced by maternal MED in offspring may be due to an increase in the number of DA-synthesizing neurons in the VTA. Immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) was used to assess the number of TH-immunopositive cells in adult offspring of WAG/Rij rats born to mothers fed control diet or MED and subjected or not subjected to behavioral testing for 2 consecutive days in the light-dark choice, open field, elevated plus maze and forced swimming tests. One hour after the forced swimming test animals were anesthetized. Brains were fixed using transcardial perfusion. The number of DAergic neurons was determined by the number of TH-immunopositive cells on brain slices at the level of VTA. The number of TH-immunopositive cells was counted in left and right hemispheres separately. A significant effect of maternal MED on the number of cells in the VTA expressing TH has been established. Adult WAG/Rij offspring born to mothers fed MED had an increased number of TH-immunopositive cells as compared with the offspring born to mothers fed control diet. Moreover, in WAG/Rij offspring born to mothers fed MED, the number of TH-immunopositive cells was greater in animals subjected to behavioral testing compared with animals not subjected to behavioral testing. The effects of maternal MED and behavioral testing on the number of TH-immunopositive cells in the VTA were equally expressed in the left and right hemispheres of the brain. Results suggest that maternal MED in the perinatal period can affect the developing mesolimbic DAergic brain system, promoting the generation and/or maintenance of DA neurons in the VTA, and thereby prevent the occurrence of genetic absence epilepsy and comorbid depression in the offspring of WAG/Rij rats.

*Keywords:* absence epilepsy, comorbid depression, dopaminergic neurons, VTA, maternal methyl-enriched diet, mesolimbic dopamine system, WAG/Rij rats